



## Commento al controllo circolare B9 Microbiologia 2012-1

**Campione A:** Infezione da ferita postoperatoria

**Requisiti:** Batteri potenzialmente patogeni

(genere e specie)

**Determinazione della resistenza a 6 antibiotici rilevanti per l'infezione**

Il campione conteneva un ceppo di *Staphylococcus aureus* sensibile a meticillina–oxacillina (MSSA). La diagnosi della specie non era difficile (pigmento giallo, reazione alla coagulasi positiva). Si noti che le rare specie coagulasi positive che non sono *S. aureus* non formano pigmenti (Man Clin Microbiol (MCM)10th ed, p. 310-11).

La MIC per oxacillina su MHA era di 1.0 mg/L, su MHA con NaCl2% era di 0.75 mg/L (nessuna differenza!); il diametro della zona di inibizione con dischetti da 1 µg oxacillina era di 15 mm (CLSI), con dischetti da 30 µg cefotossina (surrogato di oxacillina) era di 29 mm, dunque era evidente una sensibilità ad oxacillina/meticillina sia secondo criteri EUCAST che secondo CLSI. In biologia molecolare, la ricerca di *mecA* e leucocidina Pantone-Valentine (PVL) risultavano negative. Analogamente era negativo il test di agglutinazione del latex accoppiato agli anticorpi monoclonali anti-PBP2a (Denka Seiken) che individuano il trascritto di *mecA*. Il ceppo produceva beta lattamasi (*blaZ*), che risultava in ben delimitati (!) aloni di resistenza a penicillina e ampicillina e che veniva evidenziato nel test alla nitrocefina; dopo induzione quest'ultimo era chiaramente positivo entro 5 minuti, spiegando anche la relativamente alta MIC con oxacillina.

È da notare che le linee direttive (EUCAST 2012 e CLSI 2012) non consigliano più di testare le beta lattamasi per gli stafilococchi: se i bordi della zona di inibizione per per ampicillina e penicillina sono ben delineati ma il diametro è superiore ai valori limite, allora va riportata la resistenza a penicillina e ampicillina (così è descritto anche in CLSI 2012). Il motivo è l'insufficiente sensibilità del test nitrocefina-beta lattamasi, soprattutto in forma di dischetti. Il ceppo era inoltre resistente a tetraciclina, ma sensibile a amoxicillina-acido clavulanico (MIC 15 mg/L), eritromicina, clindamicina, aminoglicosidi, fluorochinolone e rifampicina.

*Staphylococcus aureus*

Quantità  
68

**Campione B: Striscio congiuntivale da congiuntivite**

**Requisiti: Batteri potenzialmente patogeni  
(genere e specie)**

**Determinazione della resistenza a 4 antibiotici rilevanti**

Il campione conteneva un ceppo di *Haemophilus influenzae*, l'agente più comune della congiuntivite batterica infantile (Ped Infect Dis J 2005; 24:823-8). Questi ceppi in genere non sono sierotipizzabili. Spesso si tratta di un'infezione associata del tratto respiratorio superiore. Nel preparato gram si identificavano coccobacilli gram negativi, fra i quali si trovavano bacilli filiformi (per una figura vedi Manual of Clinical Microbiology 10th ed, p. 592). L'inoculazione di tutti i campioni congiuntivali necessita agar con 5% sangue equino + 20 mg/L beta-NAD (vedi metodica EUCAST) o un tradizionale agar cioccolato con ematina, poichè *Haemophili* non crescono su agar sangue di pecora. La determinazione della specie può essere fatta utilizzando il test del satellitismo, meglio con enterococchi e su terreni BHIA o TSA, poichè altri terreni basali possono contenere tracce di ematina (J Clin Microbiol 1984; 20:599-601), e poichè gli stafilococchi comunemente usati possono produrre sufficiente catalasi come surrogato dell'ematina (J Med Microbiol 1972; 5:509-14). Più affidabile è il test porfirinico, che riflette la sintesi di ematina (*H. influenzae* è negativo, metodica vedi MCM p. 596). La biotipizzazione si effettua con test per l'indolo, l'ornitina decarbossilasi e l'urea, per es. in API NH System. Il ceppo del campione era positivo in tutti e tre i test e pertanto biotipo nr. 1, che tuttavia è raro nelle congiuntiviti (J Infect Dis 1983; 147:800-6).

Importante, perchè frequente, è la resistenza di *H. influenzae* ad ampicillina, che può essere dovuta a beta lattamasi oppure a PBP anomale (cosiddetta BLNAR). Il primo meccanismo è più comune e non interessa le cefalosporine (al contrario del secondo); si identifica con il test alla nitrocefina o con dischetti di fenossimetilpenicillina (PEN V!) (vedi EUCAST, tabelle Break-point). Le direttive EUCAST hanno proposto di recente come screening l'uso di dischetti di penicillina da 1 unit, ma la penicillina non andrebbe riportata. I valori limite per ampicillina sono validi solo se la beta lattamasi è negativa, il ceppo del campione era positivo, per cui per ampicillina deve essere riportata la resistenza. Ulteriori test vanno condotti su agar sangue equino, come sopra citato. Il ceppo era resistente a penicillina, ampicillina e amoxicillina, sensibile a amoxicillina-acido clavulanico, cefalosporine, rifampicina, fluorochinolone (moxifloxacina collirio!), cotrimossazolo, e resistente a tetracicline. La terapia della congiuntivite è locale (pomata o gocce).

	Quantità
<i>Haemophilus influenzae</i>	65
<i>Haemophilus species</i>	1

**Campione C: Saliva da polmonite (paziente MGC)**

**Requisiti: Batteri potenzialmente patogeni  
(genere e specie)**

I campione conteneva un ceppo del complesso *Burkholderia cepacia*, che oggi comprende un totale di 17 specie gram negative non fermentanti (MCM 10, S. 699). Si riscontrano soprattutto nelle infezioni polmonari di pazienti con mucoviscidosi (Clin Infect Dis 2003; 37:780-5) e granulomatosi cronica (MGC; J Clin Microbiol 1975; 1: 425-8); sono patogeni degli ambienti umidi (Emerg Infect Dis 2007; 13:458-61) e possono essere trasmessi da paziente a paziente (Lancet 1990; 336:1094-6) o attraverso oggetti contaminati e infusioni (J Clin Microbiol 1996; 34:584-7). Aumentano la morbilità e la mortalità nei suddetti gruppi di pazienti e appartengono alle specie multiresistenti. In vitro sono probabilmente efficaci fluorochinolone, cotrimossazolo, ceftazidim, imipenen e meropenem, inoltre minociclina e cloramfenicolo (!)( Chest 2005; 128:2336-46, Antimicrob Ag Chemother 2007; 51:1085-8).

L'utilizzo di terreni selettivi (agar PC, agar OFBPL, agar BCSA) porta a tassi di isolamento decisamente più alti (J Clin Microbiol 1997; 35:614-9; e 1999; 37:1004-7). L'identificazione della specie (MCM 10th ed, p. 699) con sistemi commerciali è spesso impossibile (J Clin Microbiol 2002; 40:1743-8), ed è necessario effettuare un sequenziamento. Il ceppo del campione formava colonie grigie su SBA e, dopo due giorni, un pigmento leggermente giallo, che si notava anche su agar TSI. Su agar McConkey crescevano dopo 3 giorni colonie rosso scure (ossidazione del lattosio) e su agar CEPA colonie rosa (*Burkholderia cepacia* Agar Base, Oxoid). API 2ONE (0067577) dava «*B. cepacia*» (= complesso di *B. cepacia*) con il 99% di probabilità e con un valore T di 0.94; Vitek2 (0663651413540310) diagnosticava «Gruppo *B. cepacia* ». Le reazioni biochimiche delle specie più comuni, *B. cenocepacia* (chiamata in passato Genomovar III) e *B. multivorans*, non corrispondono a questi codici e a questa pigmentazione; abbiamo quindi considerato valide sia la diagnosi «complesso di *B. cepacia*», sia la diagnosi di tutte le specie comprese nel complesso.

*Burkholderia cepacia*

Quantità  
68

**Campione D:** Puntato pleurico da empiema

**Requisiti:** Batteri potenzialmente patogeni  
(genere e specie)

Il campione conteneva un ceppo di *Actinomyces odontolyticus*. Questo patogeno ricorre nella saliva umana e soprattutto in campioni patologici del tratto respiratorio (Emerg Infect Dis 2003; 9:1629-32). La convinzione, talvolta riscontrata, che tutte le specie gram positive appartenenti al genere Actinomiceti siano anaerobi obbligati, formino diramazioni nel preparato gram e producano drusen (granuli di zolfo) nel tessuto, rispecchia in realtà la situazione di solo alcune di queste specie. La maggioranza delle specie oggi conosciute, più di venti, è aerotollerante e mostra spesso morfologie puramente corineformi (difteroidi), con o senza diramazioni. Drusen si riscontrano quasi esclusivamente nelle infezioni con gli anaerobi primari *A. israelii* e *A. meyeri* (J Clin Microbiol 2002; 40:3442-8). Comuni a tutte le specie di Actinomiceti sono particolari caratteristiche chemotassonomiche, i cui prodotti finali della degradazione del glucosio possono essere determinati in alcuni laboratori: le specie di Actinomiceti formano soprattutto acido succinico, acido acetico e acido lattico, al contrario di lattobatteri e bifidobatteri. Le caratteristiche biochimiche possono essere determinate con l'aiuto di sistemi commerciali (API Coryne, APUI 20A, Rapid ANA II, Vitek 2 ANC card); tuttavia non in tutte le banche dati sono rappresentate tutte le specie, per cui un'identificazione affidabile risulta a volte impossibile (J Clin Microbiol 2004; 42:418-20 e 2011; 49:1745-9).

*A. odontolyticus* è aerotollerante, forma dopo almeno due giorni colonie lisce, non aderenti, con pigmento da bruno a rosso porpora, e mostra bacilli difteroidi con ramificazioni occasionali. I tentativi di identificazione del ceppo mediante gallerie API e Vitek 2 non hanno fornito una chiara diagnosi della specie, lo stesso vale per il sequenziamento in MALDI-TOF (!). Il succinato era il principale prodotto della degradazione del glucosio. Invece, diverse caratteristiche morfologiche suggerivano *A. odontolyticus* (formazione di pigmento, colonie lisce, diramazioni solo occasionali). *A. odontolyticus* può essere separato da altri actinomiceti pigmentati (*A. radidentis*, *A. urogenitalis*, *A. graevenitzii*) mediante test di riduzione del nitrato, di N-acetil-glucosaminidasi e di idrolisi di esculina. La separazione da altri generi (*Lactobacillus*, *Bifidobacterium*) avviene mediante l'aspetto delle colonie e la morfologia microscopica, caratteristiche biochimiche (soprattutto riduzione del nitrato) e determinazione degli acidi grassi metabolici (vedi MCM 10 p. 818 e seguenti).

Desideriamo informare che sotto [www.swissmicrobiology.ch](http://www.swissmicrobiology.ch) → Medical Microbiology, o direttamente della prima pagina in basso attraverso «Swiss Antibiogram Committee» → access to documentation, si trovano documenti introduttivi della Commissione Svizzera Antibiogrammi sulle direttive EUCAST per gli antibiotici. A metà aprile verrà pubblicata la versione 2012, in cui vengono confrontate EUCAST 2012 e CLSI 2012.

	Quantità		Quantità
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	40	<i>Corynebacterium</i> species	1
<i>Actinomyces meyeri</i>	8	Gram positive Stäbchen	2
<i>Actinomyces pyogenes</i>	1	<i>Streptococcus mitis / oralis</i>	1
<i>Actinomyces israelii</i>	2	<i>Arcanobacterium haemolyticum</i>	1
<i>Actinomyces</i> Species	11	keine Angabe	1
<i>Actinomyces viscus</i>	1		

Distinti saluti



Prof. A.v. Graevenitz



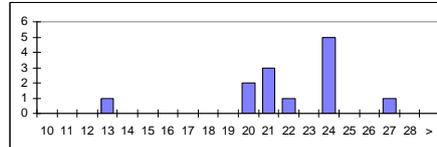
Prof. Dr. R. Zbinden



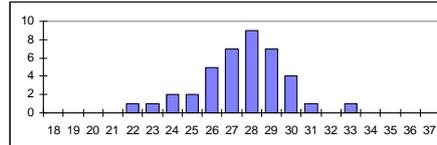
F.S. Hufschmid-Lim

## Resistenze del campione A

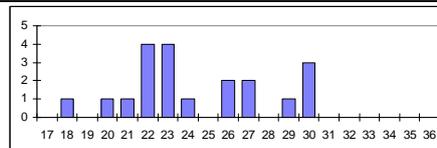
**Amoxicillina +  
acido clavulanico**



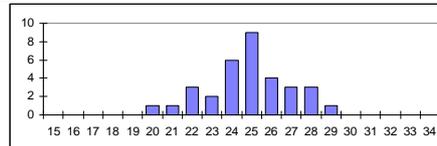
**Cefoxitina**



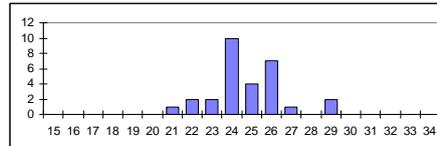
**Ciprofloxacina**



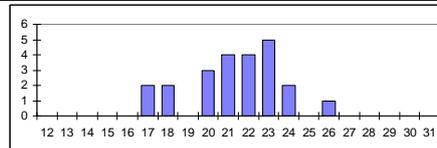
**Clindamicina**



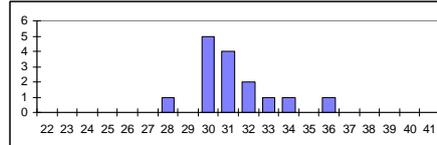
**Eritromicina**



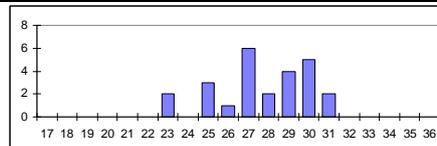
**Gentamicinaa**



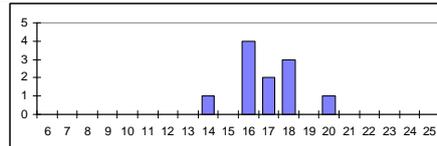
**Rifampicina**



**Sulfametossazolo/  
Trimetoprim**

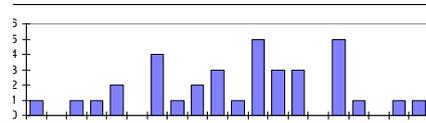


**Vancomicina**

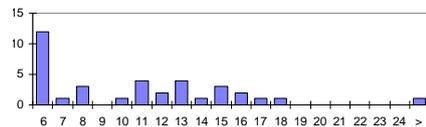


## Resistenze del campione B

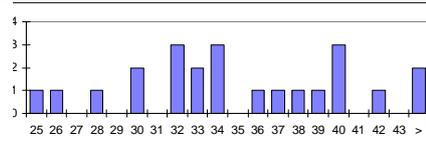
**Amoxicillin + acido clavulanico**



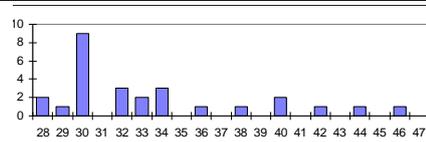
**Ampicillina**



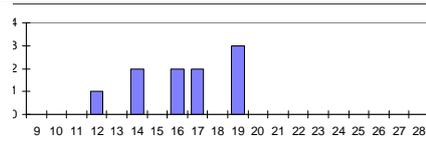
**Ceftriaxone**



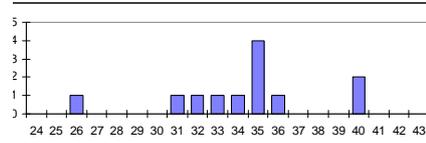
**Ciprofloxacina**



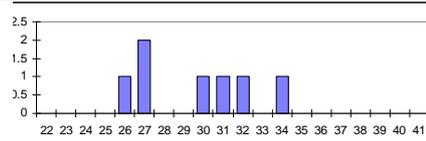
**Eritromicina**



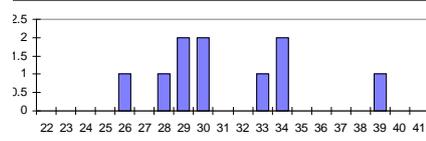
**Levofloxacina**



**Moxifloxacina**



**Ofloxacina**



**Sulfametossazolo / Trimetoprim**

